

Isolierung und Charakterisierung
eines Lipase-Inhibitors
aus Sojabohnen

1976

Klaus Potthast

Aus der Hals-, Nasen- und Ohren-Klinik der
Universität München
Direktor: Prof. Dr. H. H. Naumann

Isolierung und Charakterisierung
eines Lipase-Inhibitors
aus Sojabohnen



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig Maximilians-Universität zu
München

vorgelegt
von
Klaus Potthast
aus
Brakel

1976



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr.rer.nat. K. Hochstraßer
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. H. H. Naumann
Dekan:	Prof. Dr. med. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	27.1.1976

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A EINLEITUNG	1
B THEORETISCHER TEIL	3
I. Zur Pathogenese der akuten Pankreatitis	3
II. Bemerkungen über Enzym-Inhibitoren	9
1. Vorkommen und Bedeutung von Enzym-Inhibitoren	9
2. Wirkungsweise von Enzym-Inhibitoren und Arten der Hemmung	11
3. Zusammenfassende Erkenntnisse über Enzym-Inhibitoren dargestellt am Beispiel der Proteinase-Inhibitoren	13
III. Bemerkungen über lipolytische Enzyme	14
1. Vorkommen und physiologische Aufgaben der Lipasen	14
2. Biochemischer Aufbau und Einordnung der Lipasen	14
3. Eigenschaften der Pankreaslipase	15
C ERGEBNISSE	18
D EXPERIMENTELLER TEIL	20
I. Material	20

	Seite
1. Enzym	20
2. Substrat	20
3. Reagenz	20
4. Übriges Material	20
5. Herstellung der Gebrauchslösung	21
II. Methodik und Durchführung	23
1. Prinzip des Nachweises von anti- lipolytischer Aktivität	23
2. Durchführung	24
2.1. Gewinnung des Rohlipidextrak- tes aus Sojabohnen	24
2.2. Testverfahren zum Nachweis antilipolytischer Aktivität	25
2.3. Aufstellung einer Hemmkurve für den Rohlipidextrakt	27
3. Versuche zur Isolierung des Hemm- stoffes	30
3.1. Prinzip der Isolierung von Substanzen	30
3.2. Durchführung	31
3.21 Suche nach einem geeig- neten organischen Lö- sungsmittel für eine op- timale dünnschichtchroma- tographische Auftrennung des Gesamtlipidgemisches	31
3.22 Auftragen des Lipidge- misches auf D.C.-Platten	32
3.23 Entwickeln der D.C.-Plat- ten	32

	Seite
3.24 Nachweis der getrennten Substanzen	33
3.25 Ergebnisse der Fließmittelsuche	34
3.26 Auftrennung des Gesamtlipidextraktes unter Verwendung der Säulenchromatographie	36
3.3 Ergebnisse der ersten säulenchromatographischen Trennung des Gesamtlipidextraktes aus Sojabohnen bei gleichzeitiger dünnschichtchromatographischer Kontrolle der eluierten Fraktionen	37
3.4 Weitere Auftrennung der inhibitorisch aktivsten Fraktion (Fraktion IV) des Gesamtlipidextraktes durch Rechromatographie	40
3.41 Ergebnisse der rechromatographischen Auftrennung der Fraktion IV	43
3.5 Dünnschichtchromatographische Prüfung der inhibitorisch aktivsten Unterfraktion der Fraktion IV (Fraktion c) auf Einheitlichkeit	46
4. Versuche zur Charakterisierung des Hemmstoffes	48
4.1 Phospholipidnachweis	48
4.2 Alkalische Hydrolyse	
E SCHLUSSBEMERKUNG	53
F LITERATURVERZEICHNIS	55

A EINLEITUNG

Für die vorliegende Arbeit gaben folgende Überlegungen den Anstoß:

1. Neuere Erkenntnisse zur Pathogenese der akuten Pankreatitis weisen auf eine ursächliche Bedeutung der Pankreaslipase bei der Entstehung der Pankreatitis hin. Dies ist ein Anlaß, nach Inhibitoren für lipolytisch wirksame Enzyme zu suchen.
2. Untersuchungen über spezifische natürliche Proteasen-Inhibitoren ergaben, daß diese in besonders hohen Konzentrationen in eiweißreichen Pflanzensamen vorkommen. Vermutlich werden die darin als Vorratsstoffe gespeicherten Proteine durch Protease-Inhibitoren vor unphysiologischem Abbau geschützt. Demzufolge kann man in fettreichen Pflanzensamen, in denen Lipide als Hauptvorratsstoffe gespeichert sind, ein antilipolytisches System erwarten.

Nachdem tatsächlich eine lipase-inhibitorisch wirksame Substanz aus den Lipiden von *Arachis hypogaea* und *Papaver somniferum* isoliert werden konnte (1), befaßt sich diese Arbeit mit der Isolierung und Charak-

terisierung eines Pankreaslipase-Inhibitors aus dem
Samen von Sojabohnen.

B THEORETISCHER TEIL

I. Zur Pathogenese der akuten Pankreatitis

Die Untersuchungen der letzten Jahre haben zu neuen Erkenntnissen über die Pathogenese der akuten Pankreatitis geführt. Grundsätzlich kann die vorzeitige intrapankreatische Aktivierung von Verdauungsenzymen und ihre enzymatische Wirkung im Pankreas weiterhin als Grundprinzip der Pankreatitispathogenese angesehen werden.

Die für das Krankheitsbild charakteristischen pathoanatomischen Befunde am Pankreas und in seiner Umgebung (Pankreasparenchymnekrosen, Fettgewebnekrosen, Ödeme, Hämorrhagien) lassen sich am ehesten als Folge einer lokalen Wirkung von Verdauungsenzymen deuten. Dem Trypsin wurde dabei bis in jüngste Zeit die Hauptbedeutung zugesprochen. Dies wurde jedoch in Frage gestellt, nachdem bei tierexperimentell erzeugten Pankreatiden aktives Trypsin im Pankreas nicht nachgewiesen werden konnte (2, 3, 4, 5, 6).

Es ist deshalb Gegenstand lebhafter Diskussion geworden, welche Enzyme für die Entstehung der akuten Pankreatitis verantwortlich zu machen sind.

Nach retrograder Injektion hoher Trypsindosen in den Pankreasgang von Versuchstieren kommt es zu eindrucksvollen

vollen morphologischen Veränderungen am Pankreas, die jedoch nicht der bei der akuten Pankreatitis des Menschen beobachteten Parenchymnekrose entsprechen.

Eine fortschreitende Aktivierung proteolytischer Zymogene tritt nicht ein, vielmehr wird das injizierte Trypsin sehr rasch durch die körpereigenen Trypsin-inhibitoren inaktiviert. (7)

Chymotrypsin führt zu Veränderungen, die qualitativ der Trypsinwirkung ähnlich sind. (8)

Carboxipeptidase hat keine wesentliche Wirkung. (8)

Die Rolle des Kallikrein-Kinin-Systems in der Pathogenese der akuten Pankreatitis ist in den letzten Jahren viel diskutiert worden, ohne daß seine Bedeutung hierbei letztlich geklärt werden konnte.

Nach Injektion hoher Dosen von Kallikrein in den Pankreasgang von Ratten entwickelt sich ein ausgeprägtes, jedoch passageres interstitielles Ödem mit Leukozyteninvasion. (9) Hämorrhagien treten nicht auf, ebenso nicht Parenchymnekrosen. Einen gleichen Effekt zeigt die Injektion aktiver Kinine ins Pankreas. (10)

Zusammenfassend betrachtet stehen nach Injektionen aktiver proteolytischer Enzyme in den Pankreasgang stets ganz überwiegend die Zeichen einer Capillar- bzw. Gefäßschädigung im Vordergrund. Das bei der akuten Pankreatitis auftretende intra- und peripankreatische

Ödem sowie die häufig zu beobachtenden Hämorrhagien könnten damit erklärt werden. Die Ausbildung der Parenchymnekrose scheint jedoch nicht auf einer proteolytischen Autodigestion der Azinuszellen zu beruhen.

(2)

Nach gegenwärtigen Kenntnissen kann man sich in etwa folgende Vorstellung machen: Die amylytischen und lipolytischen Enzyme werden im Pankreas in aktiver Form gebildet. Dagegen werden die proteolytischen Enzyme in Form inaktiver Vorstufen synthetisiert. Trypsinogen wird erst im Duodenum durch eine Enterokinase zu Trypsin aktiviert. Dieses aktiviert seinerseits die ins Duodenum gelangenden proteolytischen Zymogene zu Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und Carboxypeptidase sowie Kallikrein.

Ein weiterer Schutzmechanismus besteht darin, daß mit den Zymogenen Trypsininhibitoren simultan sezerniert werden, die eine temporäre Hemmung etwa intrapankreatisch aktivierter Proteasen bewirken. Die proteolytische Aktivität kann somit unter normalen Verhältnissen nur im Duodenum auftreten.

Während die pathogenetischen Überlegungen bisher fast ausschließlich auf die proteolytischen Enzyme ausgerichtet waren, wurde den lipolytischen Verdauungsenzy-

men des Pankreas wenig Beachtung geschenkt. Die Betrachtung dieser Enzyme scheint aber insbesondere bei der Annahme eines möglichen Refluxes von Galle oder gallensäurehaltigem Duodenalinhalt in den Pankreasgang von Interesse, da sie durch Gallensäuren (im Sinne einer Substrataktivierung) aktivierbar sind. Neuere Untersuchungen machen daher für die Entstehung einer akuten Pankreatitis vorwiegend drei Enzyme verantwortlich (1, 11, 12, 13):

1. Pankreaslipase
2. Phospholipase A
3. Elastase

Pankreaslipase

Balo (14) hat erstmals die Ansicht vertreten, nicht die proteolytischen Enzyme, sondern die Lipase bilde den Ausgangspunkt für die Entstehung einer Pankreasnekrose. Von Wanke (15) wurden nach Lipaseinstillation in den Pankreasgang von Hunden Veränderungen beobachtet, die Beziehungen zur chronischen Pankreatitis des Menschen erkennen lassen. Anderson u.a. (8) berichten über die Auslösung hämorrhagischer Pankreasnekrosen bei Hunden durch intraduktuläre Infusion von Lipase. Doerr u.a. (6) fanden im Pankreas von an Pankreatitis erkrankten

Tieren histochemisch eine starke Erhöhung der Lipaseaktivität. Schmidt u.a. (2, 16) konnten zeigen, daß in Gegenwart aktivierender Gallensäuren die Lipase typische Fettgewebsnekrosen hervorruft. Warum die Fettgewebsnekrosen dabei entstehen, ist letztlich noch unklar. Möglicherweise spielt die hohe intrazelluläre Konzentration an Fettsäuren, die bei der Lipolyse der in der Fettvakuole gespeicherten Trygliceride entsteht, eine Rolle. (2)

Phospholipase A

Seit längerem kennt man die Phospholipase A als einen Hauptwirkstoff tierischer Gifte (Schlangengift, Bienen gift). Als Verdauungsenzym des menschlichen Pankreas wurde sie erst 1962 nachgewiesen. Das menschliche Pankreas ist besonders reich an diesem Enzym. Es katalysiert die Abspaltung einer Fettsäure von Lecithin, Kephalin und weiteren Glycerophospholipiden. Dadurch werden deren Lysoverbindungen (Lysolecithin, Lysokephalin) gebildet, die eine starke Cytotoxizität besitzen. Das Dünndarmepithel ist vor der Wirkung der Lysophospholipide durch eine Lysophospholipase (Phospholipase B) geschützt.

Nach Injektion einer 2 %igen Lysolecithinlösung in den Pankreasgang von Ratten beobachteten Schmidt u.a. in-

nerhalb kurzer Zeit eine weitgehende Nekrose des ganzen Pankreas. (2, 7, 17, 18) Daneben traten schwere Fettgewebsnekrosen im gesamten Bauchraum auf. In vitro läßt sich die Lysolecithinbildung in menschlichen Gallen-Pankreassekretgemischen zeigen. (18) Die intrapancreatale Injektion von Phospholipase A allein führt bei Ratten zu keinen stärkeren Nekrosen. Aber schon in Gegenwart geringster Gallenmengen, deren wesentlichster Bestandteil Lecithin ist, kommt es zu schwersten Nekrosen. In einem solchen nekrotischen Pankreas lassen sich hohe Konzentrationen an Lysolecithin nachweisen. (17, 18)

Die schwere nekrotisierende Wirkung von Phospholipase A auf das Pankreas konnte auch von Anderson u.a. (8) in Experimenten an Hunden nachgewiesen werden. Gjone u.a. (19) fanden ein rasches Auftreten aktiver Phospholipase A im Pankreasexudat nach retrograder Injektion von Trypsin und Gallensäuren in den Pankreasgang von Hunden. Ferner ließen sich hohe Konzentrationen von Lysolecithin nachweisen.

Im Pankreas von an akuter Pankreatitis Verstorbenen lassen sich ebenfalls hohe Konzentrationen von Lysolecithin nachweisen.

Elastase

Über die Elastase haben Geokas u.a. (13) ausführliche Untersuchungen angestellt. Danach ähneln die morphologischen Befunde nach intrapankreatischer Injektion von Elastase denen der "Trypsin-Pankreatitis". Eine Elastolyse als Zeichen einer enzymatischen Wirkung der Elastase konnte auch nach Galle- oder Trypsininjektion ins Pankreas von Hunden (13) sowie bei der menschlichen Pankreasnekrose nachgewiesen werden. (20)

Zusammenfassung

Die beschriebenen neueren Vorstellungen zur Pathogenese der akuten Pankreatitis mit besonderer Blickrichtung auf die möglicherweise ursächliche Bedeutung der Pankreaslipase bei der Entstehung von Pankreatiden geben Anlaß, nach Inhibitoren dieses lipidspaltenden Enzyms zu suchen.

II. Bemerkungen über Enzym-Inhibitoren

1.) Vorkommen und Bedeutung von Enzym-Inhibitoren

Enzyme sind als Katalysatoren der lebenden Zelle verantwortlich für die Steuerung von Stoffwechselvorgängen. Eine nicht weniger wichtige Bedeutung bei diesen

biologischen Regulationsabläufen ist allerdings auch den Inhibitoren dieser Enzyme zuzuschreiben.

Im Jahre 1929 beschrieben Kraut, Frey und Werle einen Hemmstoff für Kallikrein, der mit dem von Kunitz und Northrop 1936 aus Rinderpankreas isolierten Trypsin-inhibitor identisch ist. (21 - 31) Viele Arbeitsgruppen haben sich seitdem mit der Darstellung und Charakterisierung von verschiedenen Enzyminhibitoren beschäftigt.

Untersuchungen von Fritz, Trautschold und Werle (37) haben gezeigt, daß im Pankreas aller Tierarten Enzym-inhibitoren vorkommen. Auch bei einigen Mikroorganismen und im Eiklar bestimmter Vogelarten ließen sich Proteinasehemmstoffe finden.

Die Bedeutung der vielfältig vorkommenden Proteinase-inhibitoren kann wohl darin gesehen werden, biologisch wichtige Proteinlösungen und Gewebe von Proteinstruk-tur vor körpereigenen und fremden proteolytischen En-zy-men zu schützen. In vielen Organen liegen Enzym und Inhibitor nebeneinander vor. Dabei regeln u.a. die In-hibitoren die katalytische Aktivität der Enzyme.

Den pflanzlichen Inhibitoren kommt nach Mansfield fol-gende Bedeutung zu: Er vermutet in ihnen ein Schutz-system, das den Pflanzensamen in der Ruhepause vor der Auskeimungsperiode vor vorzeitigem unphysiologi-

schem Abbau der Fette schützen soll.

2. Wirkungsweise von Enzym-Inhibitoren und Arten der Hemmung

Die Wirkungsweise von Enzym-Inhibitoren läßt sich wohl so vorstellen, daß das reaktive Zentrum des Inhibitors sich an das aktive Zentrum des Enzyms anlagert. Auf diese Weise bilden beide Partner einen Komplex, und die Aktivität des Enzyms ist blockiert.

Die meisten der von natürlichen Inhibitoren hemmbaren Enzyme besitzen im aktiven Zentrum, an dem sich die Umsetzung des Substrates vollzieht, einen Serinrest. Für die Ausbildung des Trypsin-Inhibitor-Komplexes ist wahrscheinlich ein spezifischer Lysin- oder Argininrest im reaktiven Zentrum des Inhibitors verantwortlich.

Durch chemische Modifizierung des Lysin- bzw. Argininrestes läßt sich die Hemmaktivität von Inhibitoren reversibel aufheben. (32)

Eine sog. kompetitive Hemmung liegt dann vor, wenn Substrat und Inhibitor um die Besetzung des aktiven Zentrums des Enzyms konkurrieren. Das setzt im allgemeinen eine strukturelle Ähnlichkeit von Substrat und Inhibitor voraus. Der Begriff der temporären Hemmung

wurde von Laskowski und Wu (33) für die biochemische Wirkungsweise eines Inhibitors gewählt, bei welcher der Enzym-Inhibitor-Komplex nach längerer Inkubation in freies Enzym und Spaltprodukte des Inhibitors zerfällt.

Demgegenüber spricht man von permanenter Hemmung, wenn ein Enzym-Inhibitor-Komplex auch nach längerer Inkubation oder bei Enzymüberschuß nicht in seine Teile zerfällt.

Die Inhibitoren des Serums weisen einen weiteren Hemmtyp auf. Bei diesen sehr langsam reagierenden Inhibitoren spricht man von progressiver Hemmung. Das Erreichen des Gleichgewichtes nimmt Stunden in Anspruch.

Die Komplexbildung ist irreversibel. (34)

Mit polyvalentem Hemmcharakter wird die Eigenschaft derjenigen Inhibitoren beschrieben, die fähig sind, die Aktivität verschiedener Enzyme zu hemmen.

So umfaßt das Hemmspektrum des polyvalenten Inhibitors aus Rinderorganen (Trasylol^R) sämtliche Organkallikreine, Serumkallikreine, Trypsin, Chymotrypsin A und B sowie Plasmin. (22 - 31, 35 - 37)

Neben der Gruppe der polyvalenten Inhibitoren wurden zahlreiche Inhibitoren von Fritz und Werle entdeckt, die jeweils nur ein Enzym zu hemmen vermögen. Die meisten dieser spezifischen Hemmstoffe inhibieren lediglich Trypsin. (35 - 37)

3. Zusammenfassende Erkenntnisse über Enzym-Inhibitoren, dargestellt am Beispiel der Proteasen-Inhibitoren

Proteasen-Inhibitoren stellen als Polypeptide Substrate für die entsprechenden Enzyme dar, die mit ihren sogenannten reaktiven Zentren mit den aktiven Zentren der Proteasen reagieren. Diese Reaktion kann bis zur Spaltung der am reaktiven Zentrum beteiligten Peptidbindung führen ohne Verlust der Inhibitorwirkung. Der Zerfall in Reaktionsprodukte und freies Enzym unterbleibt infolge der spezifischen Raumstruktur der Inhibitoren. Es gibt aber auch Fälle, bei denen die Spaltung besonders bei Enzymüberschuß langsam zum weiteren Abbau des Inhibitors und zur Reaktivierung des Enzyms führt. Man spricht in diesem Zusammenhang in dem einen Fall von permanenter, im anderen von temporärer Hemmung. (38, 39)

III. Bemerkungen über lipolytische Enzyme

1. Vorkommen und physiologische Aufgaben der Lipasen

Lipasen sind in der Natur weit verbreitet. (40) Es ist wohl anzunehmen, daß jede lebende Zelle Enzyme dieser Art besitzt. (40) Man findet Lipasen im Magen (41), Dünndarmschleimhaut (42, 43), Frauenmilch (44), Harn (45, 46), Serum (47), vor allem aber im Pankreas bei Mensch und Säugetieren (40, 48 - 52); es ist das lipasereichste Organ.

Die physiologische Aufgabe der Lipasen besteht in der Spaltung der Nahrungsfette. Hierbei steht die Wirkung der Pankreaslipase im Vordergrund.

2. Biochemischer Aufbau und Einordnung der Lipasen

Ihrem chemischen Aufbau nach ist die Pankreaslipase ein reines, wasserlösliches Protein mit einem Molekulargewicht von 48 000. Es soll sich um eine einzige Peptidkette handeln, die 4 Methionin-, 7 Tryptophan- und 10 Histidin-Moleküle sowie 6 Disulfidbrücken und 2 freie SH-Gruppen pro Molekül besitzt. (53)

Die Lipasen gehören zu den Hydrolasen, und zwar zur

Untergruppe der Carbonsäure-Esterasen. (48, 49, 40)
Bei den Esterasen unterscheidet man neben der Gruppe der Lipasen (Glycerinester-Hydrolasen) noch Arylesterasen (Arylester-Hydrolasen) und Carboxylesterasen (Carboxylester-Hydrolasen). Die Differenzierung der Esterasen erfolgt aufgrund ihrer Hemmbarkeit durch Inhibitoren (z.B. Diisopropylfluorophosphat = DFP oder andere Organophosphate). Die Pankreaslipase ist verhältnismäßig wenig empfindlich gegenüber Organophosphaten; DFP zeigt sogar eine stabilisierende Wirkung. (2) Diäthyl-p-Nitrophenylphosphat wirkt dagegen hemmend. (64, 65)

3. Eigenschaften der Pankreaslipase

Soweit die Substratspezifität der Lipase untersucht ist, hydrolysiert dieses Enzym Triglyceride mittel- und langkettiger Fettsäuren (40, 44, 49 - 55), wodurch zunächst freie Fettsäuren und Diglyceride entstehen. Tri-, Di- und Monoglyceride werden, mit in dieser Reihenfolge abnehmender Geschwindigkeit, gespalten.

Eine Besonderheit der Pankreaslipase besteht darin, daß sie nur auf emulgierte, wasserunlösliche Substrate einwirkt. Dabei entfaltet sie ihre Wirkung an der Grenzfläche zwischen Fettröpfchen und umgebender

wässriger Phase. (40, 49, 50)

Da Triglyceride nicht wasserlöslich sind, müssen sie bei der enzymatischen Spaltung in emulgierter Form vorliegen (49 - 63), was im Magen-Darm-Trakt durch die Salze der Gallensäuren bewirkt wird. (44)

Eine spezifische Aktivitätsbestimmung für Pankreaslipase ist nur mit Triolein bzw. dem zu 85 % aus Tiolein bestehenden Olivenöl als Substrat möglich, da alle anderen Triglyceride - bevorzugt Triglyceride kurz- und mittelkettiger Fettsäuren wie Triacetin, Tributyrin und Tricaprylin - auch von kristallisierter Schweineleberesterase gespalten werden. (44, 56, 57)

Worauf die im Vergleich zu Triolein etwa viermal höhere Aktivität des Enzyms gegenüber Olivenöl beruht, konnte bisher nicht geklärt werden. (44)

Das pH-Optimum der Pankreaslipase liegt bei 8,0 (58) bzw. 8,6 (49), der optimale Temperaturbereich bei 37°C, wie Versuche nach Reindarstellung des Enzyms zeigten. (59, 60)

Eine Verstärkung ihrer lipolytischen Aktivität erfährt die Lipase durch Ca^{++} - und Mg^{++} - Ionen, durch bestimmte Polypeptide, Peptide und Aminosäuren, vor allem aber durch Gallensäuren. Sie besitzen die Fähigkeit, die hohe Oberflächenspannung zwischen Fett und Wasser herabzusetzen und wirken somit als gute

Emulgatoren. Die durch die Emulgierung bewirkte Oberflächenvergrößerung bietet der Lipase eine größere Angriffsfläche. (15)

C ERGEBNISSE

Die dünnschicht (d.c.)- bzw. säulenchromatographische (s.c.) Isolierung eines Lipase-Inhibitors aus dem Gesamtlipidextrakt von Sojabohnen erfolgt durch geeignete Trennmittel. Von 17 untersuchten Fließmittelgemischen ist mit Petroläther (Kp. 40 - 60°C)-Diäthyläther-Eisessig (95:14:0,5) die differenzierteste Auftrennung des Substanzgemisches zu erzielen (s. Abb. 3, S.35).

Durch die erste s.c. Trennung wird der Gesamtlipidextrakt in vier Fraktionen (Fraktion I-IV, s. Tab. 1, S.38 und Abb. 4, S.39) zerlegt, von denen sich die Fraktion IV als die am stärksten hemmende Fraktion erweist; mit 10 mg dieser Fraktion läßt sich die Aktivität der Lipase um 60 % reduzieren.

Um die Fraktion IV auf weitere s.c. abtrennbare Komponenten zu untersuchen, wird sie nach weiteren d.c. Versuchen mit Petroläther (Kp. 40-60°C)-Diäthyläther-Eisessig (90:10:1) s.c. weiter zerlegt. Wir erhalten nochmals 3 Unterfraktionen (a-c, s. Tab. 2, S.44 und Abb.5, S.41), von denen die Fraktion c einen Hemmgrad von 57 %/10mg inhibitorisch wirksamer Substanz erzielt, also noch fast maximal hemmt.

Bei einer d.c. Prüfung der Unterfraktion c auf Einheitlichkeit zeigt sich, daß eine weitere Auftrennung dieser Substanz mit der beschriebenen d.c. Methode nicht

erreicht werden kann. Dies stellt jedoch noch keinen Beweis für das Vorliegen einer einheitlichen Substanz dar.

Mit dem isolierten Lipidextrakt erhält man ähnliche Hemmkurven, wie sie bei Proteasenhemmstoffen gefunden wurden. Lineare Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration ist bis zu einem Hemmgrad von etwa 50 % der erreichbaren Endhemmung gegeben.

Zur Charakterisierung der s.c. gewonnenen Lipidkomponente wird untersucht, ob sie ein phospholipid- bzw. aminophosphatidhaltige Verbindung darstellt. Mit keiner der beschriebenen d.c. Nachweismethoden konnte die inhibitorisch wirksame Lipidkomponente als phospholipidhaltige Verbindung erkannt werden.

Die durchgeführte alkalische Hydrolyse führt zum Verschwinden der Hemmwirkung: weder die verseifbare noch die unverseifbare Lipidfraktion bewirkt eine Verminderung der Lipaseaktivität.

D EXPERIMENTELLER TEIL

I. Material

1. Enzym: Lipase (E.C. 3.1.1.3.) aus Schweinepankreas, (Serva)

Aktivität: 1 mg spaltet bei pH 7,4 und 37°C pro Stunde 15 - 20 μ val Essigsäure aus Triacetin oder 75 - 125 μ val Ölsäure aus Olivenöl.

Es handelt sich um eine "echte" Lipase, die nur an der Oberfläche emulgierter Öle in Aktion tritt, im Gemisch mit ca. 20 % Esterase, etwas Diastase und Protease.

2. Substrat: Oleum olivae neutralisatum sterilisatum (Olivenöl, Ph. H. V., Siegfried, Zofingen)
3. Reagenz: Gummi arabicum, feingepulvert, ausgelesen, D.A.B. 7, MERCK

4. Übriges

Material: - Sojabohnen, keimfähig

- D.C.-Alufolien für Dünnschichtchromatographie, Merck, Kieselgel 60 F 254, Schichtdicke 0,25 mm

- Kieselgel G für Säulenchromatographie Korngröße: 0,063 - 0,200 mm (70 - 230 mesh ASTM) MERCK

- Sprühreagenz: 2'7' - Dichlorfluoreszein 0,1 % für Chromatographie, MERCK
- Lauf- bzw. Fließmittel, alle p.a., MERCK
- METROHM - Autotitrator
- Fraktomat
- Magnetrührer
- Ultra-Turax
- Küchenmixgerät
- 10 x 100 cm Glassäule mit Glasfritte, Teflonhahn mit Olive
- 5 x 30 cm Glassäule mit Glasfritte, Teflonhahn mit Olive
- Kunststoffschläuche, widerstandsfest gegen organische Lösungsmittel
- Vorratsgefäß (2l)
- Rotationsverdampfer mit Wasserstrahlpumpe und temperiertem Wasserbad
- Rührwerk
- Glastrog (21 x 21 x 9 cm) für Dünnschichtchromatographie
- Kapillarröhrchen
- Erlenmeyerkolben verschiedener Größe
- Eichpuffer ph 7 und ph 9,5
- auf 25°C thermostatisiertes Wasserbad

5. Herstellung der Gebrauchslösungen

50 mg% ige Lipaselösung

10 mg Lipase werden in 20 ml aqua dest. mit Magnet-

rührer verteilt und anschließend auf pH 8,6 titriert.

Lösung muß für jeden Testansatz neu zubereitet werden.

0,1 n Natronlauge

100 ml 1-n- Natronlauge (Titrisol, MERCK) im Meßkolben mit aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.

10% ige Gummi-arabicum-Lösung

50 g Gummi arabicum und 450 ml aqua bidest. werden ca. 15 min. im Mixgerät gemischt, bis Substanz vollständig gelöst ist. Lösung dann in Meßzylinder überführen und mit bidest. Wasser auf 500 ml auffüllen. 1 Tag stehenlassen, damit sich der Schaum setzt, und in Glasflasche bei + 4°C aufbewahren (ca. 4 Wochen haltbar).

Olivenölemulsion

4 Teile Gummi-arabicum-Lösung (10 %) + 1 Teil Olivenöl D.A.B. 6 bzw. 7 im Meßzylinder mischen. Mischung 2 min mit Ultra-Turax emulgieren und anschließend die Emulsion mit 1-n- HCl auf ca. pH 9 titrieren. Emulsion in Glasflasche geben und im Kühlschrank aufbewahren (ca. 1 Woche haltbar).

Lipidextrakt-Emulsion

Die auf antilipolytische Aktivität zu prüfenden Lipi-

de bzw. Lipidfraktionen werden ebenfalls als Emulsion in den Test eingesetzt. Diese wird wie folgt hergestellt:

- 1) Von den zu prüfenden Lipiden bzw. Lipidfraktionen werden jeweils definierte Mengen in Petroläther-Diäthyläther (9:1) gelöst und konserviert.
- 2) Von 1) wird eine definierte Menge entnommen und das Petroläther-Diäthyläthergemisch unter Vakuum abgedampft.
- 3) Zu den verbleibenden Lipiden werden 20 ml der 10 %igen Gummi-arabicum-Gebrauchslösung hinzugegeben und beides 2 min. mit dem Ultra-Turax emulgiert.

Diese Lipid-Emulsion wird zur Bestimmung der lipase-inhibitorischen Wirkung benutzt.

II. Methodik und Durchführung

1. Prinzip des Nachweises von antilipolytischer Aktivität

Nach dem von W. Rick (49) angegebenen Verfahren werden die durch die lipolytische Aktivität der Lipase aus

einer Olivenölemulsion bei 25° C freigesetzten Fettsäuren bei ph 8,6 kontinuierlich mit NaOH titriert. Dadurch wird das für die enzymatische Reaktion optimale ph konstant gehalten, so daß keine Puffersubstanzen zugesetzt werden müssen. Die Zugabe des Alkali wird durch einen Autotitrator gesteuert und gleichzeitig graphisch als Kurvenverlauf registriert.

Die enzymatisch freigesetzten und dann kontinuierlich titrierten Fettsäuren sind ein Maßstab für die Aktivität der Lipase. Diese wird durch Zusatz von Lipidextrakt-Emulsion aus Soja-Bohnen gehemmt, was sich an entsprechend geringerer Zugabe von Alkali bei der Titration der freiwerdenden Wasserstoffionen zeigt.

2. Durchführung

2.1. Gewinnung des Rohlipidextraktes aus Sojabohnen

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung eines Lipaseinhibitors dient ein Rohextrakt aus Sojabohnen.

Letzterer wird folgendermaßen gewonnen:

1000 g Sojabohnen werden mit dem Mixgerät zunächst mit kleinster, dann mit höchster Umdrehungszahl zerkleinert und anschließend mit 5 lit. Aceton versetzt.

5 Std. lang wird dieses Sojabohnen-Aceton-Gemisch intensiv gerührt. Der so gewonnene Aceton-Rohextrakt

mit den darin enthaltenen Gesamtlipiden wird nun durch Vakuumfiltration von festen Partikeln getrennt, der Niederschlag auf dem Filterpapier mit Aceton nachgewaschen. Die Entfernung des Acetons erfolgt durch anschließendes Abdampfen unter Vakuum. Es verbleibt ein Gesamtlipidextrakt von ca. 80 g, welcher mit 100 ml Petroläther-Diäthyläther (9:1) im Kühlschrank für die folgenden Tests konserviert wird.

2.2 Testverfahren zum Nachweis antilipolytischer Aktivität

In Anlehnung an die von Hochstraßer und Feuth (1) modifizierte Methode von Tietz und Weber (54, 61) zur Bestimmung der Serumlipaseaktivität wurden folgende Titrationsansätze zum Nachweis antilipolytischer Aktivität verwendet:

Ansatz 1 = Leerwertansatz

	10 ml Gummi-arabicum-Emulsion
+	2 ml 50 mg% ige Lipaselösung
+	10 ml Olivenölemulsion
	22 ml Reaktionsgemisch

Ansatz 2 = Hemmansatz

10 ml Lipidextrakt-Gummi-arabicum-Emulsion
+ 2 ml 50 mg% ige Lipaselösung
+ 10 ml Olivenölemulsion

22 ml Reaktionsgemisch

Die als Folge der Enzymreaktion zur Konstanthaltung des pH 8,6 notwendige NaOH-Zugabe wird zugleich von einem angeschlossenen Dosigraph aufgezeichnet. Dabei ergeben sich folgende Titrationskurven für Ansatz 1 (ungehemmte Reaktion) und Ansatz 2 (gehemmte Reaktion).

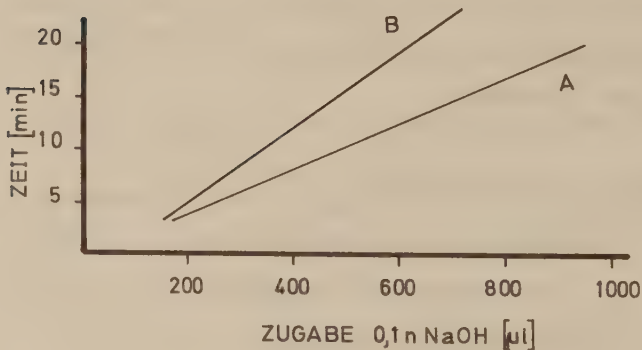


Abb. 1 Kontinuierliche Titration der durch die Wirkung der Pankreaslipase freigesetzten Fettsäuren
Kurve A = ohne Zusatz v. Lipidextrakt = Leerwert
Kurve B = mit Zusatz von Lipidextrakt = Hemmwert

Eine Hemmwirkung des Lipidextraktes liegt vor, wenn der Verbrauch an NaOH im Ansatz 2 geringer ist als im Ansatz 1. An dem steileren Kurvenverlauf der Kurve B zeigt sich, daß zur Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Wertes von 8,6 weniger NaOH pro Zeiteinheit zum Reaktionsgemisch zugegeben werden muß. Dies entspricht einer im Vergleich zur Kurve A geringeren Aktivität der Lipase, die nach dem oben gesagten also durch den Zusatz von Lipidextrakt gehemmt wird.

2.3 Aufstellung einer Hemmkurve für den Rohlipidextrakt

Um einen Zusammenhang zwischen der Konzentration des zugefügten Rohlipidextraktes und der Hemmwirkung herauszufinden wird folgender Ansatz für den Test verwendet:

10 ml Gummi-arabicum, emulgiert mit einer Ausgangsmenge von 150 mg Lipidextrakt
+ 2 ml 50 mg% ige Lipaselösung
+ 10 ml Olivenölemulsion
22 ml Endvolumen

Die Auswertung der jeweiligen Hemmwerte geschieht nach dem oben unter 2.2 beschriebenen Verfahren, wobei der Leerwert nach jedem 3. Hemmtest erneut bestimmt wird.

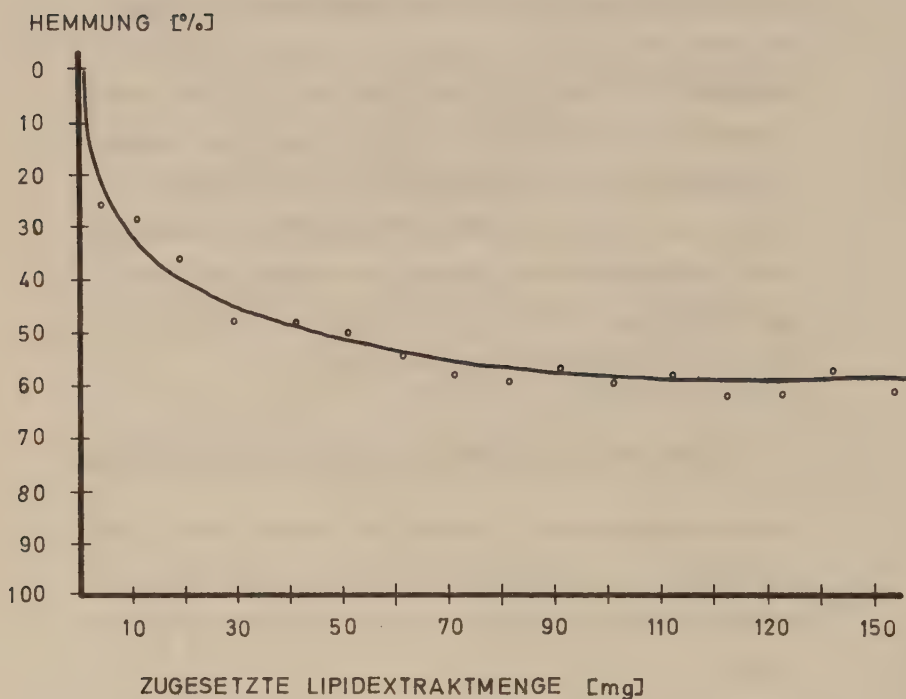


Abb. 2 Hemmkurve für den Rohlipidextrakt aus Sojabohnen

Diskussion

Der Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Mengen des Sojabohnenextraktes und der dadurch jeweils bewirkten Hemmung der Lipaseaktivität ist aus der Hemmkurve

ersichtlich. Man erhält ähnliche Hemmkurven, wie sie bei Proteasenhemmstoffen gefunden wurden. Lineare Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration ist bis zu einem Hemmgrad von etwa 50 % der erreichbaren Endhemmung (60 %) gegeben. Damit ist bewiesen, daß es sich bei den mit dem Sojabohnengesamtlipidextrakt erzielbaren Hemmgrad keineswegs um einen Zufallsbefund oder etwa um Wirkungen von Effektoren handelt. Eine vollständige Hemmung der Wirkung der Pankreaslipase ist auch bei großem Hemmstoffüberschuß nicht möglich. Dies kann an unspezifischen Esterasen liegen, die nach Angaben der Herstellerfirma zu 20 % im verwendeten Lipasepräparat enthalten sind.

Die erneute Bestimmung des Leerwertes nur nach jedem dritten Hemmtest erscheint vertretbar, da die Streuung der Leerwerte zwischen 0 % und 8 % liegt. Gleiche Werte bestätigen sich auch bei einer Reihenuntersuchung von 50 Leerwerten, bei denen die Schwankungen der Genauigkeit ebenfalls zwischen 0 % und 10 % liegen.

Zur Charakterisierung des Hemmverhaltens wird festgestellt, daß die Hemmung sofort nach Zugabe des Substrats zum Reaktionsgemisch eintritt und permanent ist. Auch bei Lipaseüberschuß kommt es über einen längeren Zeitraum zu keinem Nachlassen der Hemmwirkung; gemes-

sen wurden 10 Stunden.

Die Hemmung geht von einem Lipid aus, das selbst als Substrat wirken kann. Die festgestellte Hemmwirkung beruht wahrscheinlich auf einer Substrathemmung und ist als kompetitive Hemmung aufzufassen.

3. Versuch zur Isolierung des Hemmstoffes

3.1 Prinzip der Isolierung von Substanzen

Um die antilipolytisch wirksame Substanz aus dem Gesamtlipidextrakt zu isolieren, wird nach einem Lösungsmittel gesucht, das eine Auftrennung in möglichst viele Komponenten des Rohextraktes gewährleistet.

Zur Trennung kleinster Substanzmengen hat sich nach der durch Stahl (62) erfolgten Standardisierung des Verfahrens die dünnschichtchromatographische Analyse sehr gut bewährt: Auf dünnen Sorptionsmittelschichten werden punktförmig aufgetragene Lösungen von Substanzgemischen mit verschiedenen Lösungsmitteln entwickelt. Die getrennten Substanzen werden nach Besprühen mit einem fluoreszierenden Nachweisreagenz im UV-Licht sichtbar gemacht.

Die mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie erzielte Trennung kleinster Substanzmengen des Gesamtlipidextraktes läßt sich mit dem Verfahren der Säulenchroma-

tographie im präparativen Maßstab erreichen.

3.2 Durchführung

3.21 Suche nach einem geeigneten organischen Lösungsmittel für eine optimale dünnschichtchromatographische Auftrennung des Gesamtlipidgemisches

Zur Ermittlung der günstigsten Trennbedingungen im später sich anschließenden säulenchromatographischen Trennungsverfahren bzw. zur Suche des optimalen Laufmittels werden dünnschichtchromatographische (d.c.) Vorversuche durchgeführt. Unter 17 Lösungsmittelgemischen wird dasjenige gesucht, das die differenzierteste Auftrennung des Gesamtlipidextraktes bewirkt.

Bei der Auswahl der Laufmittel dienen die von verschiedenen Autoren mitgeteilten "eluotropen Reihen" als Hilfe, in denen die Laufmittel nach steigender Elutionswirkung geordnet sind. Da die meisten pflanzlichen Lipidgemische freie Fettsäuren enthalten, ist es ratsam, Laufmittel mit 1 - 2 % Eisessig zu verwenden, welcher eine d.c. Schwanzbildung vermeiden soll.

3.22 Auftragen des Lipidgemisches auf D.C.-Platten

Das zu trennende Gesamtlipidgemisch wird in der vorliegenden Lösung von Petroläther-Diäthyläther (9:1) auf die D.C.-Platten aufgebracht. Dazu werden die Auftragungspunkte mit dünnem Bleistift markiert, und zwar 1,5 cm vom unteren Rand der D.C.-Platte entfernt und im Abstand von 2 cm. An diesen Punkten, die auch Startpunkte genannt werden, erfolgt das Auftropfen kleinster Mengen der Lösung. Es ist dabei darauf zu achten, daß die Substanzlösung auf kleinstem Raum am Startpunkt zusammenbleibt, was für den genauen Trenneffekt sehr wichtig ist. Als Limit gilt ein Tropfendurchmesser von 5 mm. Aufgetragen werden insgesamt ca. 10 - 20 μ l.

3.23 Entwickeln der D.C.-Platten

Zur Entwicklung der D.C.-Platten stellt man 1 oder 2 Platten in eine Glaskammer mit luftdicht abschließendem Deckel. Der Boden der Kammer ist mit dem betreffenden Lösungsmittel 1 cm hoch bedeckt.

Um bei der Entwicklung der Platten sogenannte Randphänomene (63) zu vermeiden, werden die beiden großflächigen Kammerwände mit Filterpapier ausgeschlagen, welches am Boden in das Laufmittel eintaucht. Der Luftraum der Kammer ist so mit Fließmittel gesättigt.

Als Randphänomen wird die Tatsache bezeichnet, daß Zonen gleichartiger Substanz nicht in einer Höhe liegen, sondern unterschiedliche R_F -Werte aufweisen, die von der Mitte zu beiden Rändern hin zunehmen.

Durch die beschriebene Verwendung von Filterpapier wird ein weiterer Vorteil erreicht; die Laufzeit des Fließmittels verkürzt sich etwa um ein Drittel.

Sobald die Fließmittelfront 14 cm Abstand vom Startpunkt erreicht hat, wird die Platte aus der Glaskammer genommen und an der Luft getrocknet.

3.24 Nachweis der getrennten Substanzen

Durch geeignete Nachweisreagenzien werden die getrennten Substanzen sichtbar gemacht. Dazu werden die trockenen D.C.-Platten mit einer 0,1 %igen äthanolischen 2'7'-Dichlorfluoreszein-Lösung besprüht und nach nochmaligem Trocknen an der Luft unter UV-Licht (366 nm) betrachtet. Hier erscheinen alle Lipide als gelblich-grün fluoreszierende Flecken, deren Begrenzungen mit einem Bleistift markiert werden.

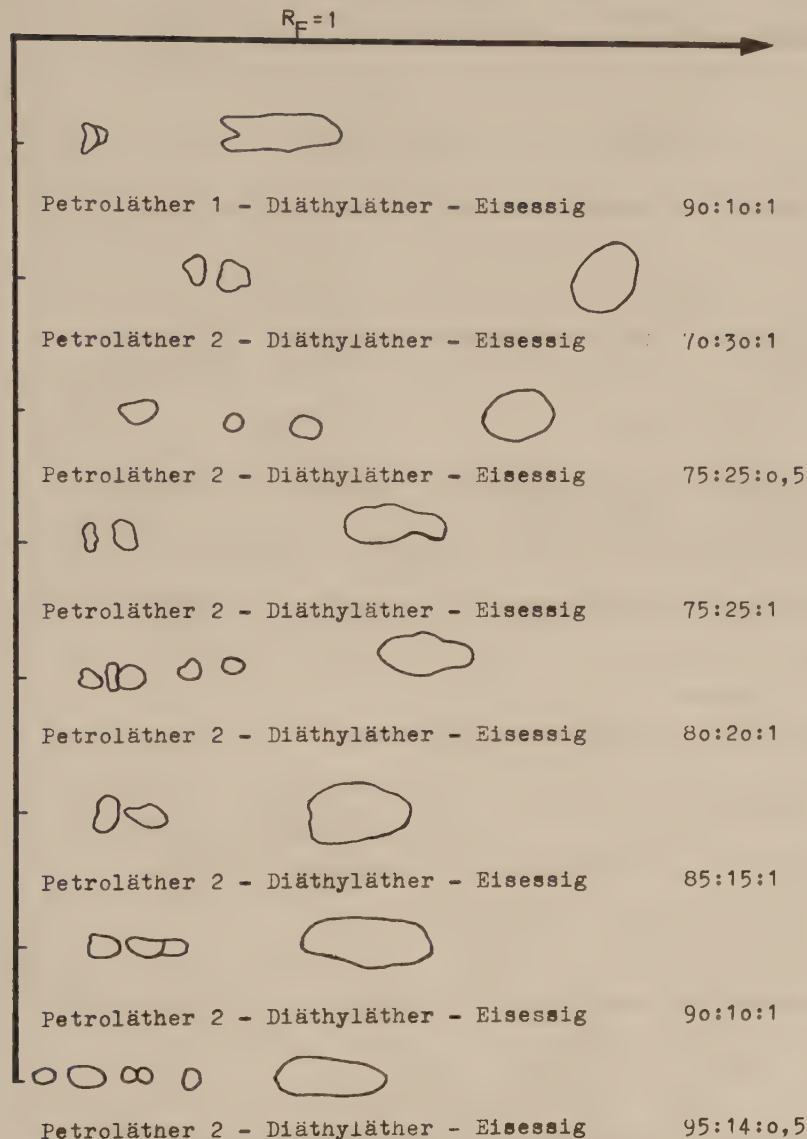
Zur Dokumentation der Chromatogramme werden die mit Bleistift vorgenommenen Markierungen auf Transparentpapier übertragen. Die Mittelpunkte der markierten Flecken werden gekennzeichnet und deren Abstand von der Linie der Startpunkte gemessen.

Die R_F -Werte der einzelnen getrennten Substanzen ergeben sich dann aus dem Quotienten der Abstände Fleck - Startpunkt und Front des Fließmittels - Startpunkt.

3.25 Ergebnis der Fließmittelsuche

Bei der Suche nach einem geeigneten Fließmittel zur dünn-schicht- bzw. säulenchromatographischen Auftrennung des Gesamtlipidextraktes aus Sojabohnen zeigt sich, daß unter 17 Fließmittelgemischen mit Petroläther (Siedepunkt: $40 - 60^{\circ} \text{C}$) - Diäthyläther-Eisessig (95 : 14 : 0,5) die differenzierteste Auftrennung des Substanzgemisches erreicht werden kann. (Abb. 3)

Abb. 3: Ermittlung eines optimal wirkenden Trennmittels für den Gesamtlipidextrakt aus Sojabohnen

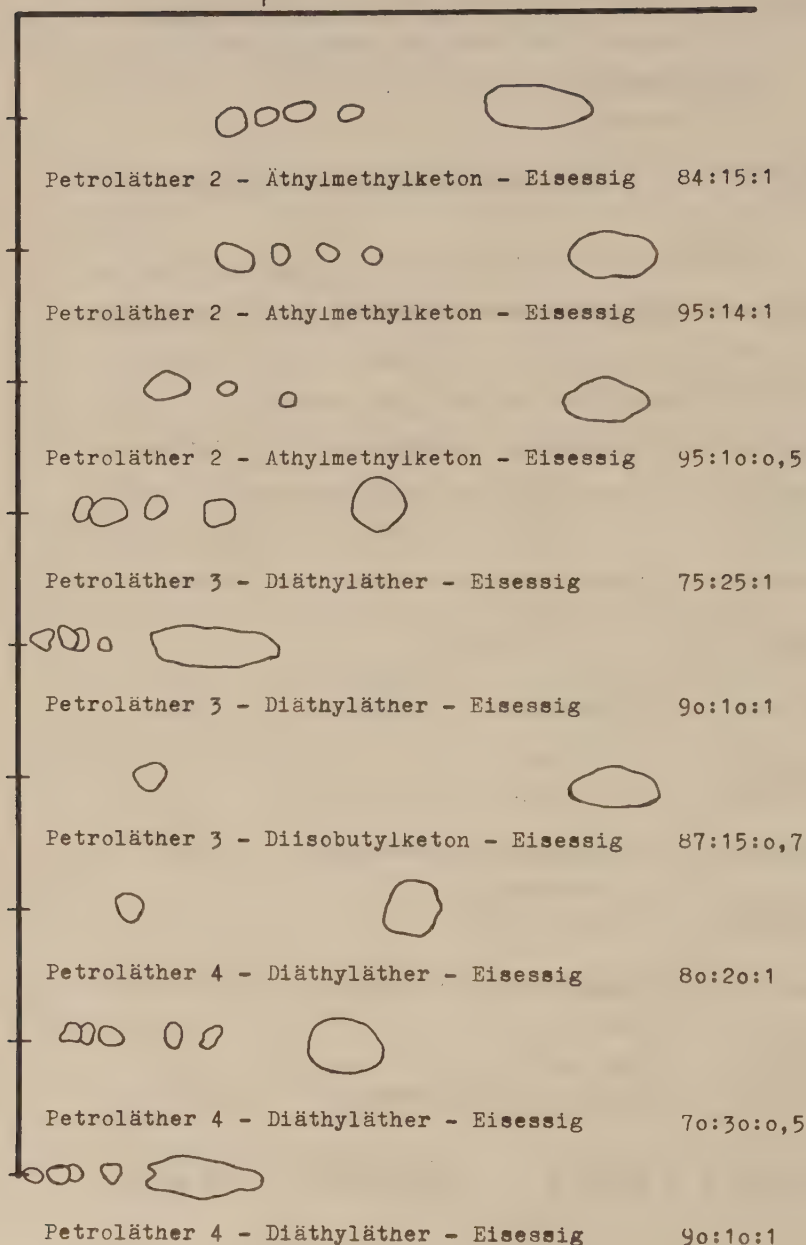


Petroläther 1 = Kp 30-50 C
 Petroläther 2 = Kp 40-60 C

Petroläther 3 = Kp 50-70 C
 Petroläther 4 = Kp 60-80 C

Fortsetzung der Abb. 3

$R_F = 1$



3.26 Auftrennung des Gesamtlipidextraktes unter Verwendung der Säulenchromatographie

Kieselgel wird mit Petroläther-Diäthyläther-Eisessig (95 : 14 : 0,5) äquibriert und in eine Glassäule von 10 x 100 bzw. 5 x 40 cm eingefüllt und über Nacht stehengelassen; hierdurch wird die Füllung ausreichend kompakt.

Vor dem Auftragen der zu trennenden Substanz läßt man etwa die einem Säulenvolumen entsprechende Menge des zur Elution benützten Fließmittels durch die Säule laufen. Anschließend läßt man den Flüssigkeitsspiegel bis knapp oberhalb des Säulenmaterials ablaufen und legt hierauf ein dem Säulenquerschnitt angepaßtes Filterpapier. Durch dieses Filterpapier wird beim Auftragen der zu trennenden Substanz ein Aufwirbeln des Kieselgels weitgehend vermieden.

Das Auftragen selbst erfolgt in der Weise, daß 80 g (bei Säule I) des extraktionsmittelfreien Gesamtlipids in 100 ml des Elutionsmittels gelöst und mit Hilfe einer Pipette vorsichtig auf das Filterpapier gebracht werden.

Nach langsam erfolgtem gleichmäßigen Einsickern der Substanz in die obersten Kieselgeschichten, welches durch geringes Öffnen des Teflonhahns der Säule erreicht wird, bringt man den Vorratsbehälter für das

Elutionsmittel auf die Säule und läßt dieses sehr langsam zulaufen.

Das Eluat wird mit einem Fraktomaten in 10 ml-Mengen gesammelt und anschließend jedes dritte Reagenzglas d.c. auf die entsprechend den Vorversuchen zu erwartenden Komponenten des Lipidgemisches untersucht.

Gläser, deren Eluate d.c. gleichen R_F -Wert aufweisen, werden vereinigt und ihr Volumen mit Hilfe des Rotationsverdampfers bis zur restlosen Entfernung des Elutionsmittels eingeengt. Es verbleibt jeweils die säulenchromatographisch abgetrennte Komponente des Lipidgemisches. Diese wird gewogen und anschließend eine quantitativ definierte Menge nach Emulgieren mit Gummi arabicum entsprechend dem beschriebenen Verfahren auf Hemmwirkung getestet.

3.3 Ergebnisse der ersten säulenchromatographischen Trennung des Gesamtlipidextraktes aus Sojabohnen bei gleichzeitiger dünnschichtchromatographischer Kontrolle der eluierten Fraktionen

Mit dem durch d.c. Vorversuche herausgefundenen optimalen Fließmittel Petroläther-Diäthyläther-Eisessig (95 : 14 : 0,5) kann der Gesamtlipidextrakt in vier Fraktionen (Fraktionen I - IV, siehe Tab. 1 und Abb.4)

aufgetrennt werden. 10 mg jeder eingeeengten und anschließend mit Gummi arabicum emulgierten Fraktion werden auf ihre antilipolytische Aktivität untersucht.

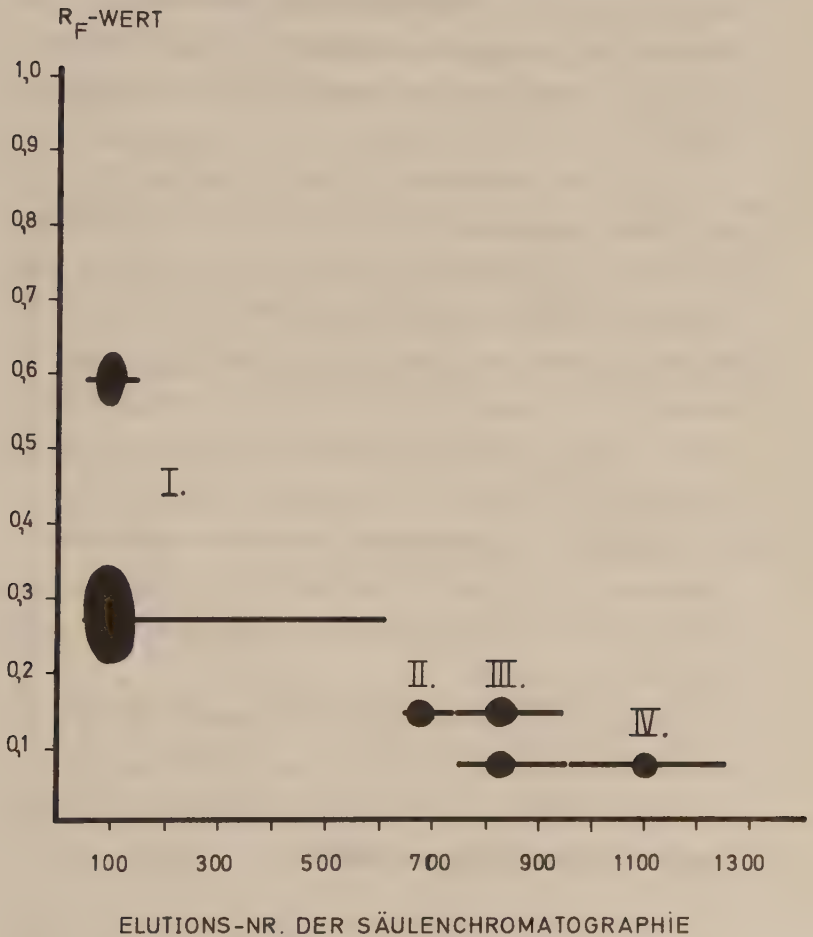
Tabelle 1: Ergebnisse der ersten s.c. Auftrennung des Sojabohnen-Gesamtlipidextraktes

Fraktions-Nr.	Elutions-Nr.	R _F -Wert der eluierten Komponenten	Inhibitorwirkung
I.	50 - 612	0,59 und 0,27	keine
II.	640- 738	0,15	keine
III.	739- 944	0,15 und 0,8	16 %/10 mg
IV.	945-1243	0,8	60 %/10 mg

Wie die Tabelle zeigt, kann mit der Fraktion IV eine Hemmwirkung von 60 %/10 mg "Inhibitor" erreicht werden.

Abb. 4: Säulenchromatographische Trennung des Gesamt-
lipidgemisches an Kieselgel

Säule 10 x 100 cm, Fraktionen zu 10 ml
Elutionsmittel: Petroläther (Kp. 40-60° C) -
Diäthyläther-Eisessig (95:14:0,5)
Eingezeichnet sind alle d.c. positiven Lipid-
komponenten. Fraktionsbereiche, in denen die
entsprechenden Substanzen gefunden wurden, sind
durch Striche gekennzeichnet.



Diskussion

Durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem unpolaren Elutionsmittel wird eine wirksame Vorfraktionierung des Gesamtlipidextraktes erreicht. Während bei den ersten beiden Komponenten keine Hemmwirkung zu verzeichnen ist, zeigen die hemmstoffhaltigen Fraktionen III und IV einen deutlich unterschiedlichen Hemmgrad. Fraktion IV mit einer antilipolytischen Wirkung von 60 % pro 10 mg getesteter Lipidmenge erscheint bei diesem ersten Trennungsschritt als einheitliche Komponente. Fraktion III enthält teilweise zusätzlich die später allein auftretende Komponente IV.

Der Grund dafür, daß Fraktion III trotz teilweiser Anwesenheit von Komponente IV nicht deren Hemmgrad erreicht, muß in einem ungünstigen Zusammenwirken beider Komponenten hinsichtlich der Hemmung gesehen werden. Die Tatsache, daß Fraktion IV in diesem ersten Trennungsschritt als einheitliche Komponente auftritt, wird durch weitere Untersuchungen auf Einheitlichkeit dieser Substanz geprüft.

Die weitgehende Übereinstimmung der Hemmkurven für den Lipidrohextrakt und für die isolierte Fraktion IV erlaubt den Schluß, daß es sich in beiden Fällen um die gleiche hemmende Substanz handelt.

3.4 Weitere Auftrennung der inhibitorisch aktivsten Fraktion (Fraktion IV) des Gesamtlipidextraktes durch Rechromatographie

Um die Fraktion IV auf Einheitlichkeit bzw. auf weitere s.c. trennbare Komponenten zu untersuchen, wird entsprechend den oben ausführlich besprochenen d.c. Vorversuchen nach einem optimalen Trennmittel für diese Fraktion gesucht.

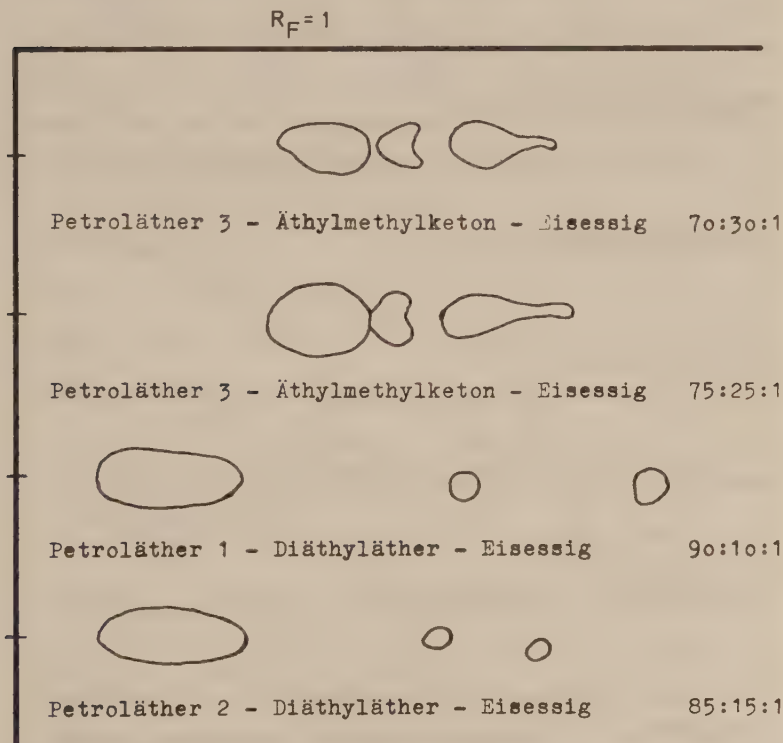
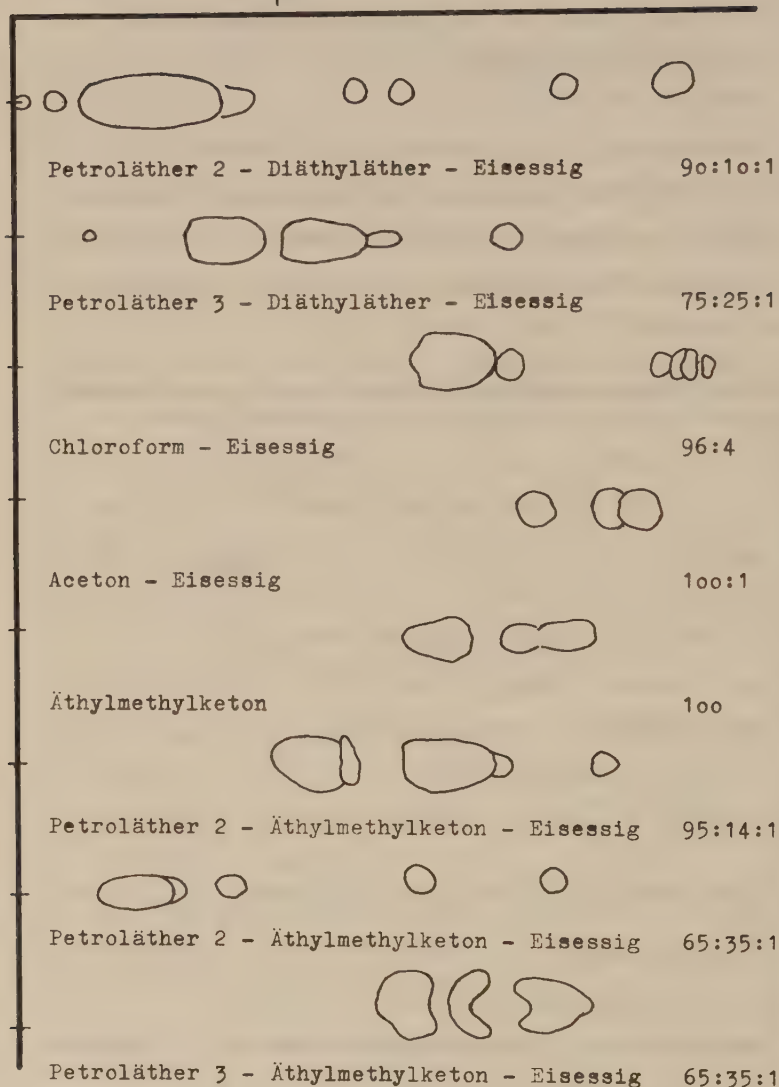


Abb.5 : Ermittlung eines optimal wirkenden Trennmittels für die s.c. gewonnene Fraktion IV

Fortsetzung der Abb.5

$R_F=1$



Petroläther 1 = Kp 30-50 C

Petroläther 2 = Kp 40-60 C

Petroläther 3 = Kp 50-75 C

Nach Abb. 5 wird die als am günstigsten zu bewertende Auftrennung durch Petroläther (Kp. 40 - 60°C) - Diäthyläther - Eisessig (90 : 10 : 1) bewirkt.

Entsprechend dem oben beschriebenen s.c. Verfahren werden 1200 mg der eingeeengten Fraktion IV auf eine zweite, kleinere Kieselgelsäule (5 x 30 cm) aufgebracht und s.c. mit Hilfe des herausgefundenen Elutionsmittels Petroläther-Diäthyläther-Eisessig (90 : 10 : 1) getrennt. Die Sammlung des Eluats erfolgt fraktioniert in Mengen zu je 10 ml, und wieder wird jedes dritte Reagenzglas auf die entsprechend den d.c. Vorversuchen zu erwartenden Komponenten der Fraktion IV untersucht.

Die Testung der d.c. positiven Fraktionen der zweiten Kieselgelsäule auf Hemmwirkung erfolgt mit definierten Mengen und nach jeweiliger Emulgierung mit Gummi arabicum.

3.41 Ergebnisse der rechromatographischen Auftrennung der Fraktion IV

Mit dem Elutionsmittel Petroläther (Kp 40 - 60° C) - Diäthyläther-Eisessig (90 : 10 : 1) kann die Fraktion IV nochmals in drei d.c. positive Komponenten (a,b,c s. Tab. 2 und Abb. 6) aufgetrennt werden. 10 mg jeder

dieser eingeeengten und mit Gummi arabicum emulgierten Fraktion werden auf Lipase-inhibitorische Wirkung untersucht.

Tab. 2: Ergebnisse der weiteren s.c. Auftrennung der Fraktion IV

Fraktion	Elutions-Nr.	R _F -Wert der eluierten Komponente	Inhibitorwirkung
a	41 - 53	0,37	27 %/10 mg
b	54 - 66	0,37 u. 0,27	26 %/10 mg
c	67 - 75	0,27	57 %/10 mg

Diskussion

Das durch Rechromatographie gewonnene inhibitorisch wirksame Lipid mit dem R_F-Wert 0,27 stellt weniger als 1 % der Gesamtlipidmenge dar (ca. 700 mg). Mit dieser Substanz werden annähernd die gleichen Hemmkurven erhalten wie mit dem Rohextrakt.

Mit einem Viertel dieser hemmenden Lipidkomponente läßt sich die Pankreaslipase zu 57 %, also noch fast maximal hemmen.

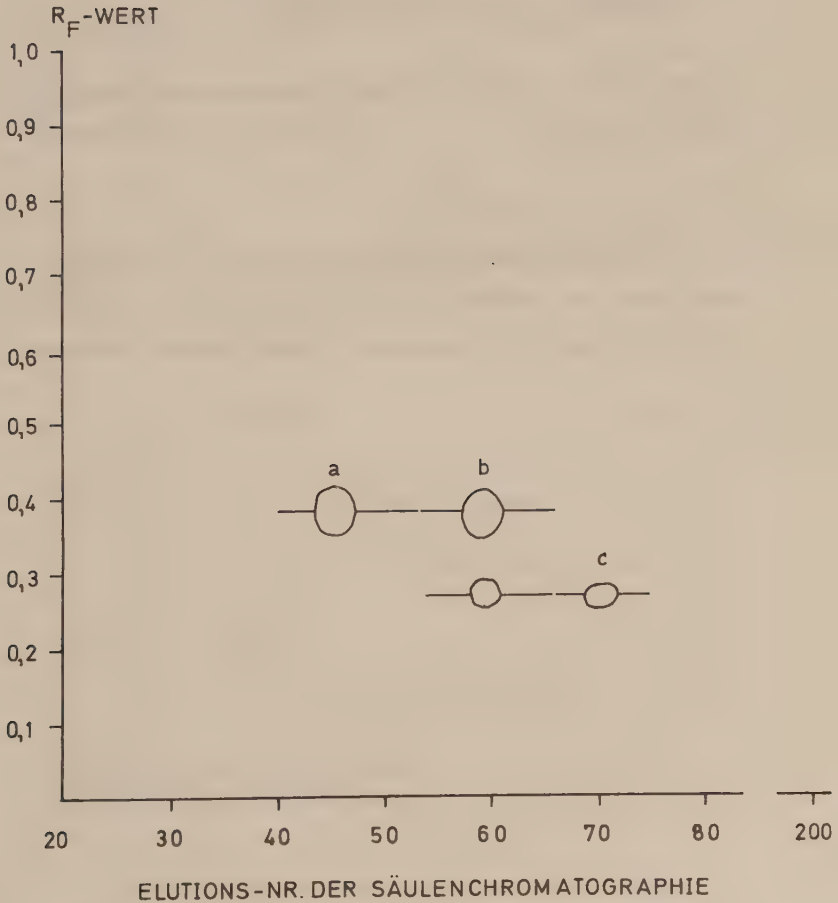
Abb.6 : Säulenchromatographische Trennung der Fraktion

IV an Kieselgel

Säule: 5 x 30 cm, Fraktionen zu 10 ml

Elutionsmittel: Petroläther (Kp. 40 - 60° C)-
Diäthyläther-Eisessig (90:10:1)

Eingezeichnet sind alle d.c. positiven Komponenten. Fraktionsbereiche, in denen die entsprechenden Substanzen gefunden wurden, sind durch Striche gekennzeichnet.



Es bleibt zu klären, ob die isolierte Fraktion c mit den Methoden der Dünnschichtchromatographie noch weiter aufzutrennen ist.

3.5 Dünnschichtchromatographische Prüfung der inhibitorisch aktivsten Unterfraktion der Fraktion IV (Fraktion c) auf Einheitlichkeit

Die Fraktion c wird in verschiedenen chromatographischen Systemen (s. Tab. 3) auf Einheitlichkeit überprüft.

Eine weitere Auftrennung konnte mit der d.c. Methode nicht erreicht werden. Dies stellt jedoch noch keinen Beweis für das Vorliegen einer einheitlichen Substanz dar.

Tab. 3: Trennmittel zur Prüfung des Lipase-Inhibitors
auf Einheitlichkeit

Trennmittel	Mischungs- verhältnis v/v
Petroläther 1 - Diäthyläther - Eisessig	90:10:1 80:20:1 70:30:1
Petroläther 2 - Diäthyläther - Eisessig	90:10:1 75:25:1
Petroläther 3 - Diäthyläther - Eisessig	90:10:1 80:20:1 70:30:1
Petroläther 1 - Äthylmethylketon - Eisessig	95:14:1 84:15:1
Benzol - Diäthyläther - Äthanol - Eisessig	50:40:2:1
Benzol - Diäthyläther - Äthanol - Eisessig	50:40:2:1
danach: Hexan - Diäthyläther	94:6
Diisopropyläther - Eisessig	96:4
danach: Petroläther 1 - Diäthyläther - Eisessig	90:10:1
Chloroform - Methanol - Wasser	65:25:4
Chloroform - Methanol - Eisessig - Wasser	65:25:4:4
n-Propanol - Wasser	70:30
Eisessig - Wasser	90:10
Chloroform - Eisessig	96:4

Petroläther 1 = Kp 40-60°C

Petroläther 2 = Kp 50-70°C

Petroläther 3 = Kp 60-80°C

4. Versuche zur Charakterisierung des Hemmstoffes

4.1. Phospholipidnachweis

Zur Charakterisierung der s.c. getrennten Lipidkomponente wird untersucht, ob sie eine phospholipid- bzw. aminophosphatidhaltige Verbindung darstellt. Dies wird durch d.c. Bestimmungen zu klären versucht.

Da zur Trennung von Phospholipiden bzw. Aminophosphatiden bevorzugt Chloroform- und Methanolgemische verwendet werden, wird die Lipidkomponente mit diesen polar wirkenden Fließmitteln getestet.

Tab. 4: Fließmittel zur d.c. Trennung von phospholipidhaltigen Lipiden

Fließmittel	Mischungsverhältnis v/v
Chloroform-Methanol-Wasser	60:25:4 60:35:8
Chloroform-Methanol-Wasser anschließend, in der zweiten Richtung: n-Butanol-Eisessig-Wasser	65:25:4 60:20:20
Chloroform-Methanol-Eisessig-Wasser n-Propanol-Wasser	60:34:4:2 70:30

Um eventuell vorliegende phospholipidhaltige Verbindungen auf den D.C.-Platten sichtbar zu machen, werden diese mit den auch in der Papierchromatographie gebräuchlichen Sprühreagenzien behandelt.

a) Ninhydrin-Reagenz

Durch die Reaktion mit Ninhydrin werden vor allem Aminophosphatide, Amine und Aminosäuren sichtbar gemacht. Die vom Fließmittel befreite D.C.-Platte wird mit einer 0,2 %igen Ninhydrinlösung in 95 ml Butanol und 5 ml 10 %iger Essigsäure besprüht. Nach 20-minütigem Erhitzen der Platte im Trockenschrank (auf 105° C) erscheinen bei Vorhandensein von Phospholipiden rot-violette Flecken auf weißem Grund.

b) Dragendorff-Reagenz

Dieses Reagenz wird ebenfalls zum Nachweis von Phosphatiden, besonders von Cholinphosphatiden, benutzt.

Herstellung der Reagenz:

Lösung 1: 0,85 bas. Wismutnitrat werden in 10 ml Eisessig und 40 ml Wasser gelöst.

Lösung 2: 8 g Kaliumjodid werden in 20 ml Wasser gelöst.

Gleiche Volumina der Lösungen 1 und 2 werden gemischt, und 1 ml davon wird mit 2 ml Eisessig und 10 ml Wasser versetzt. Nach dem Besprühen der Platte treten bei positiver Reaktion rot-orange Flecken auf.

c) Ammoniummolybdat-Perchlorsäure-Lösung

Diese Lösung stellt ein Universalreagenz zum Nachweis von phospholipidhaltigen Verbindungen dar.

Herstellung der Reagenz:

0,5 g Ammoniummolybdat werden in 5 ml Wasser gelöst und anschließend mit 1,5 ml 25 %iger Salzsäure und 2,2 ml 70 %iger Perchlorsäure versetzt. Nach Abkühlen der Lösung auf Zimmertemperatur wird das Volumen mit Aceton auf 50 ml aufgefüllt. Verwendet wird dieses Reagenz erst nach 1-tägigem Stehen.

Das Aufbringen auf die D.C.-Platten erfolgt ebenfalls durch Sprühen. Nach 2-minütigem Bestrahlen mit Infrarotlicht und anschließendem 10-minütigen Einwirken von Uv-Licht (oder 5 - 10 minütigem Erhitzen auf 110°C im Trockenschrank) erscheinen Phospholipide bei positiver Reaktion als blau-schwarze Flecken auf gräulichem Grund.

Ergebnisse:

Mit keiner der angeführten Nachweismethoden konnte die lipase-inhibitorisch wirksame Lipidkomponente als phospholipidhaltige Verbindung erkannt werden.

4.2 Alkalische Hydrolyse

Durch alkalische Hydrolyse des inhibitorisch wirksamen Lipids entstehen die wasserlöslichen, verseifbaren Alkalisalze der Fettsäuren dieses Lipids und die neutralen, unverseifbaren Verbindungen. Fettsäuregemisch und unverseifbarer Anteil werden nach Emulgierung mit Gummi-arabicum in üblicher Weise auf ihre Hemmwirkung getestet.

Durchführung:

Gleiche Gewichtsteile von Kaliumhydroxid und destilliertem Wasser werden mit 3 - 4 Teilen Methanol verdünnt. Anschließend wird die Lipidprobe mit der 10-fachen Menge dieser Kaliumhydroxid-Lösung versetzt und über 12 Stunden lang stehengelassen. Nach beendeter Verseifung verdampft man den größten Teil des Methanols im Vakuum bei weniger als 50°C und verdünnt den Rückstand mit doppeltem Volumen Wasser. Durch die un-

verseifbaren Verbindungen des Lipids erscheint die Lösung trüb.

Die unverseifbaren Anteile werden mit Diäthyläther mehrmals extrahiert und die vereinigten Ätherauszüge mit dest. Wasser neutral gewaschen. Nach Trocknen der Lösung über wasserfreiem Natriumsulfat und Verdampfen des Äthers wird die unverseifbare Lipidfraktion in der oben beschriebenen Weise auf antilipolytische Eigenschaften untersucht.

Die verseifbaren Kaliumsalze der Fettsäuren werden mit 5 n Schwefelsäure unter einer Ätherschicht angesäuert, bis die Lösung deutlich sauer reagiert. Die freigesetzten Fettsäuren werden mit dest. Wasser versetzt und anschließend über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Abdampfen des Äthers werden die Fettsäuren nach dem genannten Verfahren auf Hemmwirkung untersucht.

Ergebnis:

Die alkalische Hydrolyse führt zum Verschwinden der Hemmwirkung: weder die verseifbare noch die unverseifbare Lipidfraktion bewirkt eine Verminderung der Lipaseaktivität.

E SCHLUSSBEMERKUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus dem Samen von Sojabohnen eine Substanz isoliert, die die Aktivität der Pankreaslipase zu 57 % heruntersetzt. Um diesen Hemmgrad zu erreichen, genügen 10 mg jener Substanz. Zur spezifischen Aktivitätsbestimmung für Pankreaslipase dient ein von W. Rick (49) angegebenes Verfahren, bei dem die durch die lipolytische Aktivität der Lipase aus einer Olivenölemulsion freigesetzten Fettsäuren bei pH 8,6 kontinuierlich mit NaOH titriert werden.

Es gelang, den Pankreaslipase-Inhibitor mit den Methoden der Dünnschicht- und der Säulenchromatographie rein darzustellen und mit Hilfe des Phospholipidnachweises und der alkalische Hydrolyse zu charakterisieren. Höchstwahrscheinlich handelt es sich um ein Triglycerid.

Welche Struktureigenschaften dieses Triglycerid oder diesen triglycerid-ähnlichen Stoff zum Lipasehemmstoff machen, ist zur Zeit noch unbekannt.

Die Suche nach weiteren Inhibitoren lipidspaltender Enzyme dürfte durch folgende pathogenetische Überlegungen gerechtfertigt sein. Bei der Frage nach der Entstehung der Pankreatitis standen bisher die proteolytischen Enzyme und ihre Inhibitoren im Vordergrund. Seit jedoch nachgewiesen ist, daß durch Instillation von Lipase in das Pankreasgangsystem in Gegenwart aktivierender Gallensäure typische Fettgewebnekrosen hervorgerufen werden können, wird der Lipasewirkung bei der Entstehung von Pankreatitiden ursächliche Bedeutung zugeschrieben. Auch durch Lysolecithine, die Folgeprodukte der Wirkung von Phospholipase A, können Pankreasnekrosen erzeugt werden. Deshalb ist die Beteiligung

auch dieses Enzyms an der Entstehung der Pankreatitis äußerst wahrscheinlich, weshalb man nach Möglichkeiten sucht, die Wirkung dieses Enzyms durch therapeutische Maßnahmen zu hemmen. (39)

F LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Hochstraßer, K., Feuth, H., Werle, E.: Dissertation:
Isolierung und Charakterisierung eines Lipase-Inhi-
bitors aus *Arachis hypogaea*
- 2) Schmidt, H.: Neuere Vorstellungen zur Pathogenese
der akuten Pankreatitis
Der Internist 11 (1970) 105
- 3) Beck, I. T., Pinter, E., Schjmar, J., Mc Kenna, R.D.,
Ritchie, A. C.:
Gastroenterology 43 (1962) 60
- 4) Creutzfeld, W., Söling, H. D., Ketterer, H.:
Klin. Wochenschr. 41 (1963) 1002
- 5) Schmidt, H., Horbach, I.:
Klin. Wschr. 43 (1965) 15
- 6) Doerr, W., Diezel, P. B., Grözing, K. H., et al:
Klin. Wschr. 43 (1965) 125
- 7) Schmidt, H., Creutzfeldt, W.:
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 72 (1966) 719
- 8) Anderson, M. C., Needleman, S. B., Gramatica, L.,
Toronto, J. R., Briggs, D. R.:
Arch. Surg. 99 (1969) 185
- 9) Schmidt, H.:
Herzinfarkt und Schock. Stuttgart: Georg Thieme 1969

- 10) Papp, M., Fodor, I., Makara, G. B.:
Z. ges. exp. Med. 147 (1968) 264
- 11) Hafter, E.:
Praktische Gastroenterologie. Stuttgart: Gg. Thieme
1973
- 12) Creutzfeldt, W., Schmidt, H.:
Scand. J. Gastroenterology 5 Suppl. 6 (1970) 47
- 13) Geokas, U. C.:
Arch. Pathol. 86 (1968) 135
- 14) Balo, I.:
Beitr. path. anat. 92 (1933) 14
- 15) Wanke, M.:
Experimentelle Pankreatitis. Stuttgart: Gg. Thieme
1968
- 16) Creutzfeldt, W.:
T. Gastroent. (1970)
- 17) Schmidt, H., Creutzfeldt, W., Habermann, E.:
Klin. Wschr. 45 (1967) 163
- 18) Schmidt, H., Creutzfeldt, W., Habermann, E.:
Scand. J. Gastroent. 4 (1969) 39
- 19) Gjone, E., Ofstad, E., Marton, P. F., Amundsen, E.:
Scand. J. Gastroent. 2 (1967) 181
- 20) Geokas, M. C., Rinderknecht, H., Swanson, V.,
Haverback, B. J.:
Lab. Invest. 19 (1968) 235

- 21) Vogel, R., Trautschold, I., Werle, E.:
Natürliche Proteinase-Inhibitoren. Stuttgart:
Gg. Thieme 1966
- 22) Bauer, E., Frey, E. K., Kraut, H., Schultz, F.,
Werle, E.:
Naturwiss. 17 (1929) 672
- 23) Kraut, H., Frey, E. K., Werle, E.:
Z. physiol. Chem. 192 (1936) 1
- 24) Kraut, H., Frey, E. K., Werle, E., Schultz, T.:
Z. physiol. Chem. 230 (1934) 259
- 25) Werle, E., Maier, L., Ringelmann, E.:
Naturwiss. 39 (1952) 328
- 26) Werle, E., Appel, W.:
Z. Naturforsch. 14b (1959) 385
- 27) Werle, E.:
Z. physiol. Chem. 338 (1964) 228
- 28) Trautscholt, I.:
Vortrag: Gemeinsame Tagung der dtsh., franz. und
schweiz. Biochemiker, Zürich (1960)
- 29) Trautscholt, I., Werle, E.:
Z. physiol. Chem. 325 (1961) 48
- 30) Webster, U. E., Pierce, I. V.:
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 107 (1961) 186

- 31) Prado, I. L., Prado, E. S., Brandi, C. M. W.,
Katchburian, A. V.:
Ann. N.Y. Acad. Sci. 104 (1963) 186
- 32) Haynes, R., Feeney, E. R.:
Biochemistry 7 (1968) 2547
- 33) Laskowski, Sr., M., Wu, F. C.:
J. Biol. Chem. 204 (1953) 797
- 34) Werle, E., Zickgraf-Rüdel, A.:
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 10 (1972) 139-150
- 35) Fritz, H., Hartwich, G., Werle, E.:
Z. physiol. Chem. 34 (1966) 150
- 36) Fritz, H. Schult, H., Neudecker, M., Werle, E.:
Angew. Chem. 78 (1966) 775
- 37) Fritz, H.:
Habilitationsschrift, Med. Fak. Univ. München 1968
- 38) Fritz, H., Tscheche, H.:
Proc. Int. Res. Conf. on proteinase-inhibitors
Berlin: W. de Gruyter 1971
- 39) Hochstraßer, K., Feuth, H., Werle, E.:
Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. Bd. 353 (1972) 855
- 40) Mendele, B., Myers, D. K., Ulydert, J. E., Ruys,
A. C., Bruyn, W. M. D.:
Brit. J. Pharmacol. 8 (1953) 217

- 41) Cohen, M., Morgan, R. G. H., Hofmann, A. F.:
Gastroenterology 60 (1971) 1
- 42) Di Nella, R. R., Ming, H. C., Pork, C. R.:
J. biol. Chem. 235 (1960) 3076
- 43) Pope, J. L., McPerson, J. C., Tidwell, H. C.:
J. biol. Chem. 241 (1966) 2306
- 44) Rick, W. Heinkel, K., Schmidt, H., Sickinger, K.:
Störungen der Verdauung und Resorption. Wissensch.
Berichte Merck, Darmstadt 1971
- 45) Seligman, A. M., Glotier, P.:
Bull. New Engl. med Center 12 (1950) 28
- 46) Nothman, M. M., Pratt, J. H., Callow, A. D.:
A.M.A. Arch. internat. Med. 100 (1957) 221
- 47) Augustinsson, K.B.:
Nature 181 (1958) 1786
- 48) Machis Mouren, G. Sarda, 1., Desnuelle, P.:
Arch. Biochem. Biophys. 83 (1960) 309
- 49) Rick, W.:
Z. klin. Chem. 7 (1969) 530
- 50) Desnuelle, P. Savary, P.:
J. Lipid Res. 4 (1963) 369
- 51) Brockerhoff, H.:
Biochim. Biophys. Acta 159 (1968) 296

- 52) Julien, R., Conioni, P., Rathelot, J., Sarda, L.,
Plummer, T. H.:
Biochim. Biophys. Acta 280 (1972) 215
- 53) Desnuelle, P.:
Biochimie 53 (1971) 841
- 54) Weber, H.:
Dtsch. med. Wschr. 26 (1965) 1170
- 55) Maylie, M. F., Charles, M., Desnuelle, P.:
Biochim. Biophys. Acta 178 (1969) 196
- 56) Rick, W.:
Internist 11 (1970) 110
- 57) Rick, W., in Henning, N., Heinkel, K., Schön, H.,
Hrsg.: Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Thera-
pie der Erkrankungen des exokrinen Pankreas.
Schattauer Stuttgart
- 58) Karlson, P.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie. Gg. Thieme Stuttgart
(1970) 71
- 59) Sarda, L., Machis-Mouren, G., Desnuelle, P.:
Biochim. Biophys. Acta 24 (1957) 425-427
- 60) Sarda, L., Machis-Mouren, G., Constantin, M. J.,
Desnuelle, P.:
Biochim. Biophys. Acta 23 (1957) 264
- 61) Tietz, N., W., Borden, T., Stepleton, J. D.:
J. clin. Path. 31 (1959) 148

- 62) Stahl, E.:
Dünnschichtchromatographie. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 2. Aufl. 1967
- 63) Randerath, K.:
Dünnschichtchromatographie. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1965) 2. Auflage
- 64) Desnuelle, P., Constantin, M. J., Sarda, L.:
Bull. soc. chim. Biol. 38 (1956) 625-631
- 65) Myers, D. K., Schotte, A., Boer, H., Borsje-Bakker, H.:
Biochim. J. 61 (1955) 521-528

DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. Karl Hochstraßer, möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, für die Anregung zu dieser Arbeit und die Gewährung eines Arbeitsplatzes sehr herzlich danken.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Herbert Feuth für die überaus wertvollen Ratschläge und Antworten auf die Fragen, mit denen ich jederzeit zu ihm kommen durfte, sehr herzlich bedanken.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die freundliche Beratung und Hilfe.

LEBENS LAUF

Am 6.9.1944 wurde ich in Brakel (Krs. Höxter) geboren.

Das Reifezeugnis erhielt ich am 25.2.1966 am Städt.

Neusprl. Gymnasium in Brakel.

Nach 2-jähriger Bundeswehrdienstzeit begann ich im Sommersemester 1968 an der Universität Bonn das Studium der Naturwissenschaften und wechselte im Sommersemester 1969 zum Studium der Zahnmedizin an die Universität München. Dieses schloß ich im Sommersemester 1975 mit dem Staatsexamen ab.

